

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Tahap awal penelitian dilakukan pembelian ekstrak etanol daun sirsak dari PT. Borobudur Industri Jamu Semarang dengan nomor batch 030PQ01.5 yang dilengkapi CoA (*Certificate of Analysis*) dapat dilihat pada lampiran 1

B. Hasil Pengujian Memori Spasial dengan Uji *Morris Water Maze*

Uji *Morris water maze* merupakan model eksperimen yang sudah sejak lama digunakan dalam pengujian kemampuan kognitif dan memori pada hewan uji. Rangkaian tes di dalam uji ini terbukti dapat menggambarkan kinerja memori spasial hewan uji dengan membuat hewan uji mendayagunakan otak bagian hipokampus dengan memberikan tes yang memerlukan penggunaan asosiasi elemental dan juga asosiasi konfigural kompleks dari hewan untuk menyelesaikannya (Septiana & Puruhita, 2015). Uji memori spasial ini dengan menghitung selisih waktu latensi dari *pretest* dan *post test* selama waktu percobaan. Waktu latensi dihitung berdasarkan waktu yang diperlukan hewan uji untuk menemukan *platform*.

1. Tahap *Acquisition Trial*

Uji memori spasial dilakukan dengan uji *Morris water maze* yang terdiri dari tiga macam tahap uji yaitu *acquisition trial*, *probe trial*, dan uji kemampuan sensori-motorik. *Acquisition trial* (uji penyelamatan diri) adalah uji yang dilakukan untuk melihat proses pembelajaran dalam pembentukan memori spasial. *Acquisition trial* dilakukan 1 hari dengan 2 hari latihan sebelumnya dari setiap uji dikumpulkan data waktu yang diperlukan mencit untuk mencapai *platform* (waktu latensi) (Juananda, *et al*, 2018). Mencit dibiarkan berenang mengitari kolam untuk menemukan plat pijakan (1 inci di atas permukaan air) pada tahap *pre-training*, kemudian dibiarkan berenang untuk menemukan plat pijakan tersembunyi pada tahap uji coba diperoleh data uji *acquisition trial* saat latihan (T0) dan pra perlakuan yang dapat dilihat pada tabel 1.

Kemudian dilakukan uji memori spasial paska perlakuan (T2) diperoleh data penurunan waktu latensi mencit mencapai *platform* sebagai penggambaran proses pembelajaran (proses mengingat) mencit yang dapat dilihat pada tabel 2 dan profil penurunan waktu latensi mencit dapat pada gambar 9

Tabel 1. Data tahap uji *acquisition trial* saat latihan (T0) dan pra perlakuan (T1)

Kelompok Kontrol	T0 (detik)	T1 (detik)
Normal	27,17±0,26	26,47±0,47
Kontrol Positif	25,54±0,35	22,90±0,18
Kontrol Negatif	26,39±0,45	24,69±0,60
EEDS 100 mg/kgBB	28,60±0,63	25,64±0,47
EEDS 200 mg/kgBB	27,75±0,41	25,77±0,08
EEDS 400 mg/kgBB	26,44±0,46	25,01±0,46

Tabel 2. Waktu latensi dan penurunan waktu latensi pada *acquisition trial*

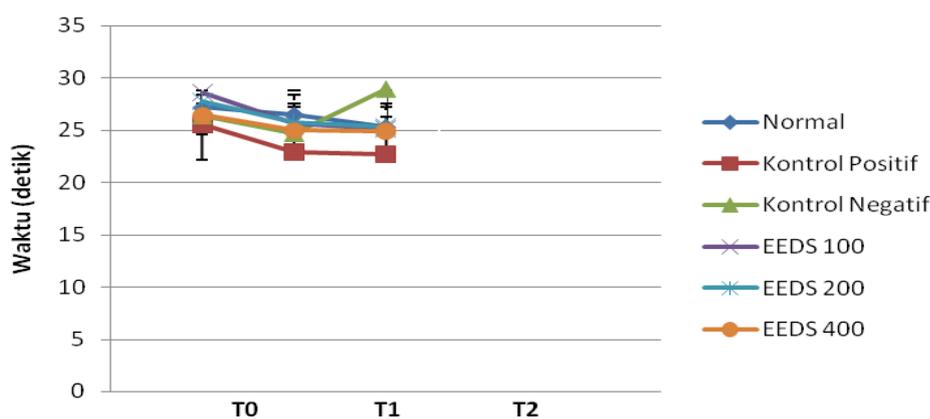
Kelompok Kontrol	T1 (detik)	T2 (detik)	Penurunan Waktu Latensi (detik)	Persentase daya penurunan waktu latensi (%)
Normal	26,47±0,47	25,29±0,20	1,18 ± 0,14 ^{a,b}	4,44±0,28
Kontrol Positif	22,90±0,18	22,70±0,47	0,20± 0,07 ^{a,c}	0,89±2,86
Kontrol Negatif	24,69±0,60	28,92±0,21	-4,23 ±0,31 ^{b,c,d}	(-)17,31±39,32
EEDS 100 mg/kg BB	25,64±0,47	25,10±0,49	0,54 ± 0,39 ^a	2,10±2,63
EEDS 200 mg/kg BB	25,77±0,08	25,29±0,13	0,48 ±0,43 ^a	1,87±0,55
EEDS 400 mg/kg BB	25,01±0,46	24,92±0,90	0,09 ± 0,07 ^{a,c}	0,38±4,71

Keterangan: (-) =ada penurunan waktu latensi, a= berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif

Berdasarkan tabel 2 dapat dijelaskan pada kelompok dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB memberikan yang setara dengan kelompok kontrol positif. Pada ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/kgBB prosentase penurunan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 2,10 %, dosis 200 mg/Kg BB terjadi 1,87% penurunan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform, sedangkan dosis 400 mg/Kg BB prosentase penurunan waktu

yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 0,38%, maka dosis 400 mg/kg BB dinyatakan sebagai dosis yang efektif.

Dari grafik di bawah menunjukkan bahwa T0 mempunyai perbedaan waktu tempuh berenang dari keenam kelompok hewan uji tanpa perlakuan pada masa latihan. Hasil T1 setelah diberi masa latihan menunjukkan perbedaan waktu tempuh lebih cepat dibanding masa latihan. Hasil dari rata-rata *escape latency* pada T2 setelah diberi perlakuan selama 5 hari, pada kelompok normal mempunyai waktu latensi yang cenderung tetap. Kelompok kontrol negatif memiliki waktu paling lama mencapai *platform* dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada kelompok negatif pemberian plumbum asetat akan menurunkan kemampuan kognitif mencit dalam menemukan *platform*.



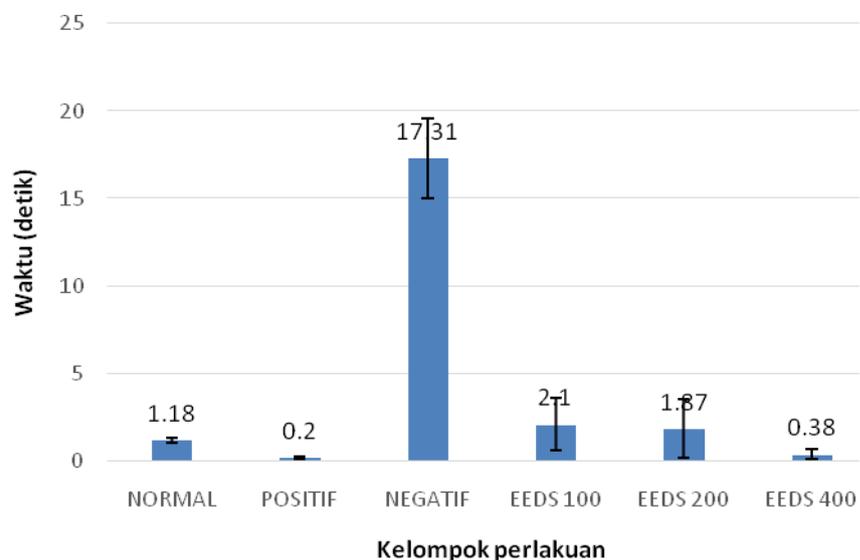
T0= Latihan, T1= Pra Perlakuan, T2= Pasca Perlakuan

Gambar 9. Profil waktu latensi pada *aquisition trial*

Kelompok kontrol positif dengan pemberian quersetin lebih cepat mencapai *platform* diikuti dosis ekstrak daun sirsak dengan dosis 400 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 100 mg/KgBB. Pemberian quersetin pada mencit lebih cepat karena quersetin merupakan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid yang mempunyai kemampuan mencegah proses oksidasi dengan cara menangkap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi (Maalik, A *et al*, 2014).

Data waktu latensi pada *acquisition trial* menunjukkan data terdistribusi normal $p=0,125$ ($p>0,05$) dan data terdistribusi homogen $p=0,064$ ($p>0,05$), sehingga dilanjutkan dengan *Post Hoc*. Hasil uji menunjukkan $p=0,000$ ($p<0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan untuk waktu latensi.

Hal tersebut berarti adanya perbedaan perlakuan menyebabkan terjadinya perbedaan memori spasial pada masing-masing kelompok. Berdasarkan hasil uji *Tukey* terdapat perbedaan bermakna antara kelompok normal dengan kelompok kontrol negatif. Perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kuersetin yang menunjukkan pemberian kuersetin dapat meningkatkan fungsi belajar pada mencit yang diinduksi plumbum acetat. Perbedaan bermakna juga terlihat antara kelompok negatif dibandingkan dengan kelompok EEDS 100 mg/kgBB, kelompok EEDS 200 mg/kgBB dan kelompok EEDS 400 mg/kgBB yang menunjukkan bahwa pemberian EEDS pada dosis tersebut dapat meningkatkan fungsi belajar mencit.



Gambar 10. Profil persentase daya penurunan waktu latensi pada *acquisition trial*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga dosis yang diujikan mempunyai efek terhadap peningkatan daya ingat. Dosis efektif ekstrak daun sirsak merupakan suatu ukuran berapa banyak obat dibutuhkan untuk menghasilkan suatu respon tertentu. Makin rendah dosis yang dibutuhkan untuk suatu respon yang diberikan, makin poten obat tersebut. Maka dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dosis efektif adalah dosis 400 mg/kgBB mencit, karena tidak mengalami perbedaan yang nyata dengan kontrol positif. Hasil ini sesuai penelitian Barnhart,*et al* (2015) dimana mencit yang dilatih menunjukkan peningkatan memori spasial setelah dilakukan latihan dengan *Morris water maze*.

2. Tahap Probe Trial

Uji memori selanjutnya adalah tahap *probe trial*. *Probe trial* merupakan uji yang dilakukan untuk melihat fungsi memori hewan uji terutama kemampuan penyimpanan memori spasial mencit setelah fase pembelajaran pada *acquisition trial*. Mencit berputar lebih lama menunjukkan peningkatan waktu latensi, sehingga dari uji tersebut diperoleh data waktu lamanya mencit berada di kuadran letak *platform* sebagai penggambaran ingatan atau memori tikus. Data tahap uji *probe trial* saat latihan (T0) dan saat pra perlakuan (T1) dapat dilihat pada tabel 3 dan data waktu latensi dan peningkatan waktu latensi pada tahap *probe trial* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 3. Data tahap uji *Probe trial* saat latihan (T0) dan pra perlakuan (T1)

Kelompok Kontrol	T0 (detik)	T1 (detik)
Normal	5,86±0,38	6,39±0,37
Kontrol Positif	2,88±0,15	4,18±0,63
Kontrol Negatif	5,04±0,27	6,96±0,31
EEDS 100 mg/kgBB	4,04±0,24	4,25±0,78
EEDS 200 mg/kgBB	3,98±0,18	5,36±0,38
EEDS 400 mg/kgBB	4,17±0,28	4,92±0,56

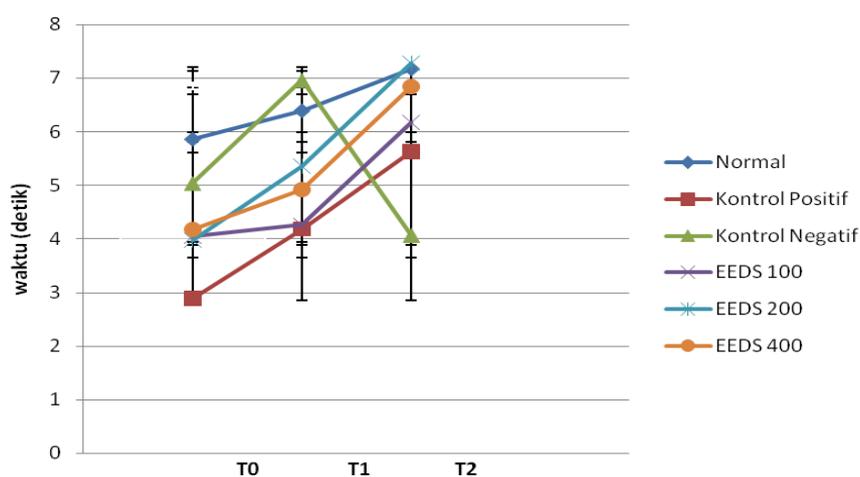
Tabel 4. Waktu latensi dan peningkatan waktu latensi pada *probe trial*

Kelompok Kontrol	T1 (detik)	T2 (detik)	Peningkatan Waktu Latensi (detik)	Persentase daya peningkatan waktu latensi (%)
Normal	6,39±0,37	7,17±0,35	0,78 ± 0,77 ^a	10,58±7,62
Kontrol Positif	4,18±0,63	5,63±0,61	1,45 ± 0,64 ^a	25,97±13,66
Kontrol Negatif	6,96±0,31	4,07±0,12	-2,89 ± 0,32 ^{b,c}	(-)71,15±8,29
EEDS 100 mg/kg BB	4,25±0,78	6,17±0,90	1,93 ± 0,28 ^a	31,60±4,48
EEDS 200 mg/kg BB	5,36±0,38	7,28±0,62	1,91 ± 0,42 ^a	26,08±3,05
EEDS 400 mg/kg BB	4,92±0,56	6,85±0,08	1,93 ± 0,86 ^a	28,06±12,29

Keterangan: (-) = ada penurunan waktu latensi, a = berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif

Berdasarkan Tabel 4 dapat dijelaskan pada kelompok dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB memberikan hasil yang setara dengan kelompok kontrol positif. Pada ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/Kg BB prosentase kenaikan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan *platform* adalah 31,60%, dosis 200 mg/Kg BB prosentase kenaikan aktifitas waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 26,08%, sedangkan dosis 400 mg/Kg BB prosentase kenaikan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 28,06%. Maka dosis 400 mg/kg BB sudah dapat memberikan efek dinyatakan sebagai dosis yang efektif.

Uji *probe test* dilakukan 24 jam setelah dilakukan uji *acquisition trial*. Dari uji ini diperoleh selisih data waktu lamanya mencit berada di kuadran letak *platform* sebelum perlakuan dan pasca perlakuan, sebagai penggambaran ingatan atau memori mencit. Menurut Vorhees & Williams bahwa objek uji *probe trial* digunakan untuk menentukan apakah hewan tersebut ingat di mana platform itu berada. Indikasi memori semacam itu termasuk jumlah crossover platform-situs, waktu dan jarak yang dihabiskan di kuadran target dibandingkan dengan kuadran lain. Data waktu kuadran dapat dilihat pada Gambar 11.



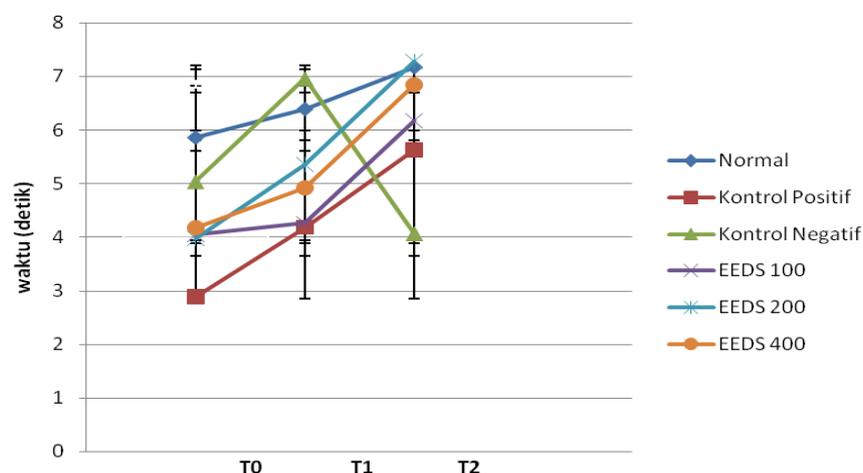
T0= Latihan, T1= Pra Perlakuan, T2= Pasca Perlakuan

Gambar 11. Profil waktu latensi pada *probe trial*

Dari grafik di atas menunjukkan bahwa T1 mempunyai perbedaan waktu tempuh berenang dari keenam kelompok hewan uji tanpa perlakuan pada masa

probe trial. Hasil T1 setelah diberi masa latihan menunjukkan perbedaan waktu tempuh lebih cepat dibanding masa latihan. Hasil dari rata-rata *escape latency* pada T2 setelah diberi perlakuan selama 5 hari, pada kelompok normal mempunyai waktu latensi yang cenderung tetap. Kelompok kontrol negatif memiliki waktu paling lama mencapai *platform* dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada kelompok negatif pemberian plumbum acetat akan menurunkan kemampuan kognitif mencit dalam menemukan *platform*.

Uji *probe test* dilakukan 24 jam setelah dilakukan uji *acquisition trial*. Dari uji ini diperoleh selisih data waktu lamanya mencit berada di kuadran letak *platform* sebelum perlakuan dan pasca perlakuan, sebagai penggambaran ingatan atau memori mencit. Menurut Vorhees & Williams bahwa objek uji *probe trial* digunakan untuk menentukan apakah hewan tersebut ingat di mana *platform* itu berada. Indikasi memori semacam itu termasuk jumlah crossover platform-situs, waktu dan jarak yang dihabiskan di kuadran target dibandingkan dengan kuadran lain. Data waktu kuadran dapat dilihat pada Gambar 11.



3. Tahap Kemampuan Sensori-Motorik

Uji selanjutnya adalah tahap uji kemampuan sensori-motorik. Tujuan dilakukannya uji kemampuan sensori-motorik adalah untuk mengetahui apakah kecepatan berenang masing-masing kelompok dipengaruhi oleh adanya kelainan atau kerusakan pada sensori-motorik hewan uji (Vorhees dan Williams, 2006). Data

tahap uji sensori-motoris pada saat latihan (T0) dan pra perlakuan (T1) dapat dilihat pada tabel 5 dan data penurunan waktu latensi mencit pada uji sensori-motorik dapat dilihat pada Tabel 6, serta profil waktu tempuh dapat dilihat pada Gambar 14.

Tabel 5. Data tahap uji sensori- motoris saat latihan (T0) dan pra perlakuan (T1)

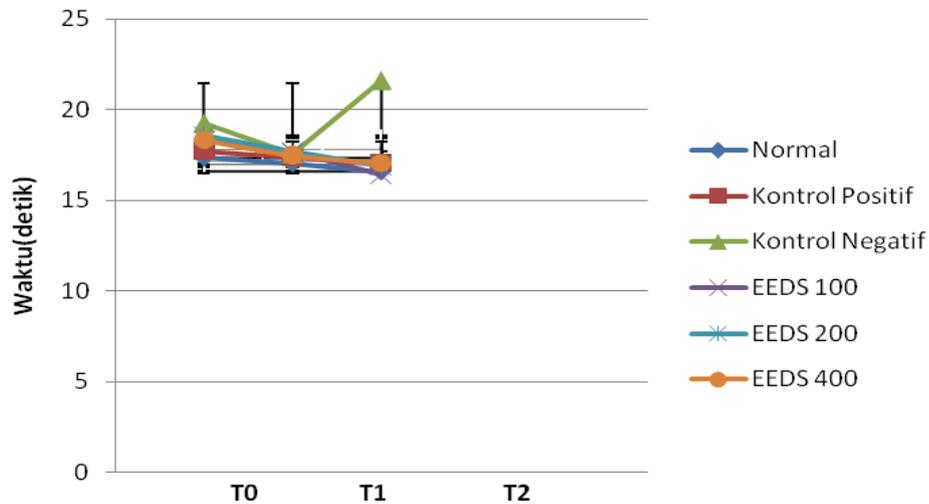
Kelompok Kontrol	T0 (detik)	T1 (detik)
Normal	17,34±0,48	17,01±0,47
Kontrol Positif	17,72±0,60	17,36±0,64
Kontrol Negatif	19,24±0,40	17,54±0,37
EEDS 100 mg/kgBB	18,34±0,49	17,69±0,28
EEDS 200 mg/kgBB	18,57±0,38	17,67±0,40
EEDS 400 mg/kgBB	18,30±0,71	17,47±0,36

Tabel 6. Waktu latensi dan Persentase Daya Penurunan waktu latensi pada Uji sensoris motoris

Kelompok Kontrol	T1 (detik)	T2 (detik)	Penurunan Waktu Latensi (detik)	Persentase daya penurunan waktu latensi (%)
Normal	17,01±0,47	16,58±0,48	0,43 ± 0,02 ^a	2,55±0,20
Kontrol Positif	17,36±0,64	17,05±0,71	0,30 ± 0,19 ^{a,c}	1,77±1,17
Kontrol Negatif	17,54±0,37	21,58±0,19	-4,04 ± 0,58 ^{b,c}	(-)23,11±3,99
EEDS 100 mg/kg BB	17,69±0,28	16,40±0,24	1,29 ± 0,37 ^{a,b}	7,28±1,95
EEDS 200 mg/kg BB	17,67±0,40	16,87±0,56	0,79 ± 0,42 ^a	4,51±2,38
EEDS 400 mg/kg BB	17,47±0,36	17,05±0,34	0,42 ± 0,25 ^a	2,38±1,39

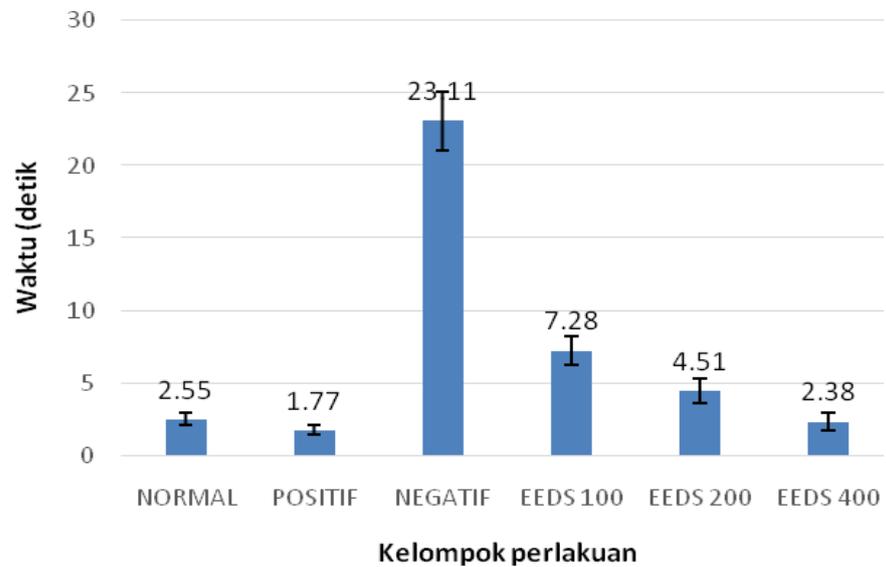
Keterangan: (-) =ada penurunan waktu latensi, a= berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif

Berdasarkan tabel 6 dapat dijelaskan pada kelompok dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB memberikan yang setara dengan kelompok kontrol positif. Pada ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/kgBB prosentase penurunan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 7,28%, dosis 200 mg/kgBB prosentase penurunan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 4,51%, sedangkan dosis 400 mg/kgBB penurunan waktu yang dibutuhkan mencit untuk menemukan platform adalah 2,38%. Maka dosis 400 mg/kg BB dinyatakan sebagai dosis yang efektif.



T0= Latihan, T1= Pra Perlakuan, T2= Pasca Perlakuan

Gambar 13. Profil waktu latensi pada uji sensoris motorik



Gambar 14. Profil persentase daya penurunan waktu latensi pada uji sensoris-motoris

Berdasarkan Gambar 14 memang terdapat perbedaan waktu tempuh antar kelompok perlakuan tetapi semua mencit pada masing-masing kelompok dapat menemukan *platform* sehingga dapat dikatakan bahwa tidak ada gangguan sensori-

motorik pada mencit yang digunakan sebagai hewan uji karena semua hewan uji dapat mencapai *platform* sebelum waktu yang ditentukan habis.

Hasil uji analisis statistik memberikan hasil data normalitas dan homogenitas yang normal ($0,162 > 0,05$) dan homogen ($0,086 > 0,050$) karena memenuhi syarat uji parametrik. Setelah itu dilakukan uji one way ANOVA satu jalur didapatkan hasil ada perbedaan bermakna dengan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,005$) selanjutnya dilakukan uji Tukey dengan membandingkan antar kelompok perlakuan. Hasil yang diperoleh kelompok positif (kuersetin) tidak ada beda nyata antar kelompok dosis. Kelompok plumbum asetat dibandingkan dengan kuersetin ada perbedaan bermakna. Begitu pula dengan kelompok plumbum asetat dibandingkan dengan semua dosis ekstrak ada perbedaan bermakna. Kelompok yang diberi ekstrak etanol daun sirsak yang paling baik berturut turut adalah kelompok ekstrak 400 mg/kgBB, kemudian kelompok ekstrak 200 mg/kgBB dan terakhir kelompok ekstrak 100 mg/kgBB. Disimpulkan bahwa kelompok dosis 400 mg/kgBB dapat meningkatkan memori spasial sehingga dapat digunakan sebagai alternatif peningkat memori yang efektifitasnya setara dengan kuersetin sebagai pembanding.

Tabel 7. Persentase Daya Perbaikan Memori Spasial

Kelompok Kontrol	Acquisition trial (%)	Probe trial (%)	Uji sensoris motoris (%)	Persentase daya perbaikan memori spasial (%)
Normal	3,01	10,58	2,55	13,59
Kontrol Positif	1,16	25,97	1,77	27,13
Kontrol Negatif	17,31	71,15	23,11	-111,57
EEDS 100 mg/kg BB	2,10	31,60	7,28	40,98
EEDS 200 mg/kg BB	1,87	17,67	4,51	24,05
EEDS 400 mg/kg BB	0,38	15,74	2,38	18,46

Keterangan: (-) = ada penurunan waktu latensi, a= berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif

Tahap uji memori spasial dengan menggunakan *morris water maze* dapat dilihat pada tabel 7. Pada tabel tersebut menunjukkan semakin tinggi persentase, maka perbaikan memori spasial semakin rendah, sedangkan semakin rendah persentase, maka perbaikan memori semakin baik. Dapat dilihat pada kontrol positif dengan persentase yang paling tinggi, menunjukkan perbaikan memori spasial

semakin rendah. Kontrol positif dan kelompok EEDS 100, 200 dan 400 mg/ KgBB menunjukkan persentase perbaikan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol normal. Kontrol positif ini menggunakan kuersetin yang terbukti memiliki efek mengurangi stres oksidatif untuk mencegah pembelajaran spasial dan defisit memori (Halder, *et al*,2015). Hasil ini sesuai penelitian Ratu,*et al* (2017), yaitu ekstrak daun sirsak mempunyai aktivitas inhibisi *acetylcholinesterase* dalam pengobatan Alzheimer di reseptor asetilkolin di otak, sehingga meningkatkan fungsi kognitif. Menurut Juananda *et al* membuktikan bahwa terdapat hubungan antara fungsi memori dengan sistem neurotransmisi di otak. Hal tersebut terjadi pada sirkuit neuronal sistem limbik terutama hipokampus. Memori diyakini terbentuk akibat penguatan aktivitas neurotransmisi/sinapsis yang disebut long-term potentiation (LTP), sebaliknya gangguan memori terjadi akibat penurunan sinapsis yang disebut *long-term depression* (LTD).

C. Uji Kadar Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) adalah suatu senyawa yang dihasilkan melalui proses nonenzimatis perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*). Dengan demikian, MDA dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh. Tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas (Yustika, *et al.*,2013). Timbal mempunyai kecenderungan untuk mengkatalisis reaksi oksidasi dan menimbulkan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS). ROS dapat menghambat produksi antioksidan sulfhidril, menghambat enzim yang memproduksi heme, merusak asam nukleat, dan menghambat perbaikan DNA. ROS juga menyebabkan reaksi peroksidasi lipid pada membran sel. Paparan timbal akan mengakibatkan biomarker stres oksidatif malondialdehid (MDA) meningkat di atas rata-rata populasi kontrol dan menyebabkan kadar GSH, glutation peroksidase, dan katalase menurun (Wiyasihati & Wigati,2016).

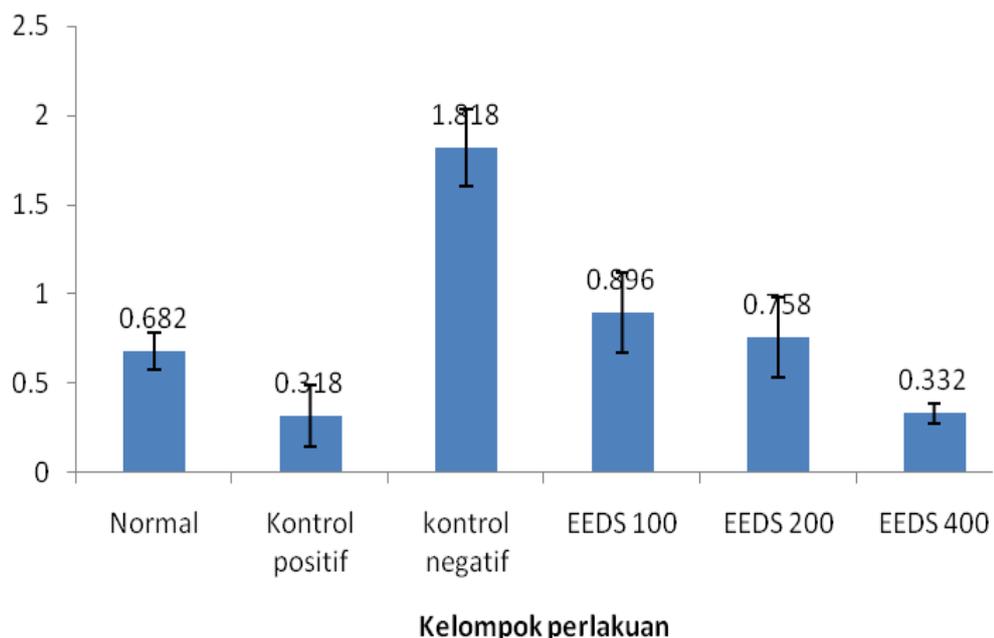
Pengukuran kadar MDA menggunakan metode TBARs (*thiobarbituric acid reactive substances*) banyak digunakan karena sederhana dan tidak memerlukan

biaya yang mahal. Pembuatan kurva standar menggunakan larutan 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP), yang diasumsikan sebagai MDA (Ohkawa *et al.*, 1979). Data kadar MDA otak mencit dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Rata-rata kadar MDA otak mencit

Kelompok	Kadar MDA (nmol/mg)
Kelompok Normal	0,682 ± 0,105 ^{a,b}
Kontrol Positif	0,318 ± 0,055 ^{a,c}
Kontrol Negatif	1,818 ± 0,094 ^{b,c}
EEDS 100mg/kgBB	0,896 ± 0,150 ^{a,b}
EEDS 200mg/kgBB	0,758 ± 0,168 ^{a,b}
EEDS 400mg/kgBB	0,332 ± 0,121 ^b

Keterangan: (-) =ada penurunan waktu latensi, a= berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif



Gambar 15. Profil uji kadar MDA otak mencit

Kadar kelompok normal MDA dalam penelitian ini adalah sebesar 0,682 nmol/ ml, kemudian dilakukan induksi dengan plumbum asetat sebesar 50 mg/kgBB pada kelompok negatif mendapatkan kadar MDA sebesar 1,818 nmol/ ml. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas peroksidasi lipid otak mencit yang diinduksi plumbum asetat meningkat dibandingkan kelompok normal. MDA merupakan parameter untuk mengetahui tingginya kadar kerusakan jaringan akibat radikal bebas

(Christianto,1966). Pemberian plumbum asetat akan menyebabkan ketidakseimbangan antara jumlah oksidan dan antioksidan di dalam tubuh baik secara tidak langsung dengan menekan enzim yang berperan sebagai antioksidan pada tubuh seperti katalase, maupun secara langsung dengan peningkatan pembentukan reaktif oksigen spesies (Ercal,*et al*, 2001). Menurut Sadek (2012) membuktikan bahwa pemberian plumbum asetat meningkatkan kadar MDA di otak, hati dan ginjal kelinci.. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian kami, yang membuktikan bahwa pemberian plumbum asetat dapat meningkatkan kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan meningkatnya proses peroksidasi lipid yang terjadi, dan proses peroksidasi lipid yang tinggi menunjukkan tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh (Christianto,1966).

Pada tabel 8 terlihat pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan tiga dosis yang berbeda terjadi penurunan kadar MDA.Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang digunakan, semakin besar pula kemampuan ekstrak tersebut dalam menurunkan kadar MDA otak mencit. Pada penelitian ini, dosis yang efektif untuk menurunkan kadar MDA otak mencit adalah dosis 400 mg/kgBB telah mampu menurunkan kadar MDA otak mencit sama dengan kelompok positif. Dapat dilihat pada gambar 15 profil uji kadar MDA otak mencit.

Perbedaan dosis ekstrak etanol daun sirsak yang diberikan berpengaruh dalam menurunkan kadar MDA pada otak mencit karena ekstrak etanol daun sirsak mengandung zat- zat yang berfungsi sebagai antioksidan. Hal ini sesuai penjelasan Vianandra (2011) daun sirsak mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, asam lemak, minyak esensial, triterpenoid, fitosterol, polifenol, dan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Ekstrak daun sirsak mengandung flavonoid yang dapat mengelat ion besi dan membentuk kompleks inert yang tidak dapat memulai peroksidasi lipid (Sadek, 2012). Flavonoid juga sebagai *scavenging* radikal bebas. Flavonoid dapat meredam radikal hidroksil (OH*) sebagai inisiator terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid membran sel yang produk akhirnya adalah MDA, sehingga senyawa flavonoid dapat mencegah awal mula terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid membran sel yang dipicu oleh radikal hidroksil (Middleton *et al.*, 2000).

Flavonoid yang terdapat di daun sirsak merupakan antioksidan yang kuat. Antioksidan akan menyebabkan terjadinya penghambatan radikal bebas dengan cara menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha & Padma 2009). Antioksidan juga akan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif sehingga pembentukan radikal bebas dapat ditekan atau dihambat (Waji & Sugrami 2009).

D. Perhitungan Jumlah Sel Piramidal Hipokampus yang Mengalami Kerusakan di Area CA1 dan CA2- CA3

Hipokampus mencit dibuat 1 potongan preparat kemudian dihitung jumlah sel di area CA1 dan area CA2-CA3. Gambaran mikroskopis hipokampus area CA1 dapat dilihat pada Gambar 16. dan gambaran mikroskopis hipokampus area CA2-CA3 dapat dilihat pada Gambar 17. sedangkan data jumlah sel di area CA1 dan CA2-CA3 mencit dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Rata-rata jumlah sel piramidal hipokampus yang mengalami kerusakan di area CA1 dan CA2-CA3

Kelompok Perlakuan	Jumlah sel pyramidal Area CA1	Jumlah sel pyramidal area CA2-CA3
Normal	2,20 ± 1,09 ^c	2,40 ± 1,14 ^c
Positif	2,00 ± 0,71 ^c	2,20 ± 0,84 ^c
Negatif	20,00 ± 2,74 ^b	15,40 ± 1,14 ^b
EEDS 100 mg/kgBB	13,8 ± 3,03 ^{b,c}	13,20 ± 2,78 ^{b,c}
EEDS 200 mg/kgBB	13,40 ± 12,21 ^{a,b,c}	7,80 ± 1,92 ^{a,b,c}
EEDS 400 mg/kgBB	3,20 ± 2,28 ^c	3,00 ± 1,58 ^c

Keterangan: (-) =ada penurunan waktu latensi, a= berbeda bermakna terhadap control normal, b = berbeda bermakna terhadap control positif, c = berbeda bermakna terhadap control negatif

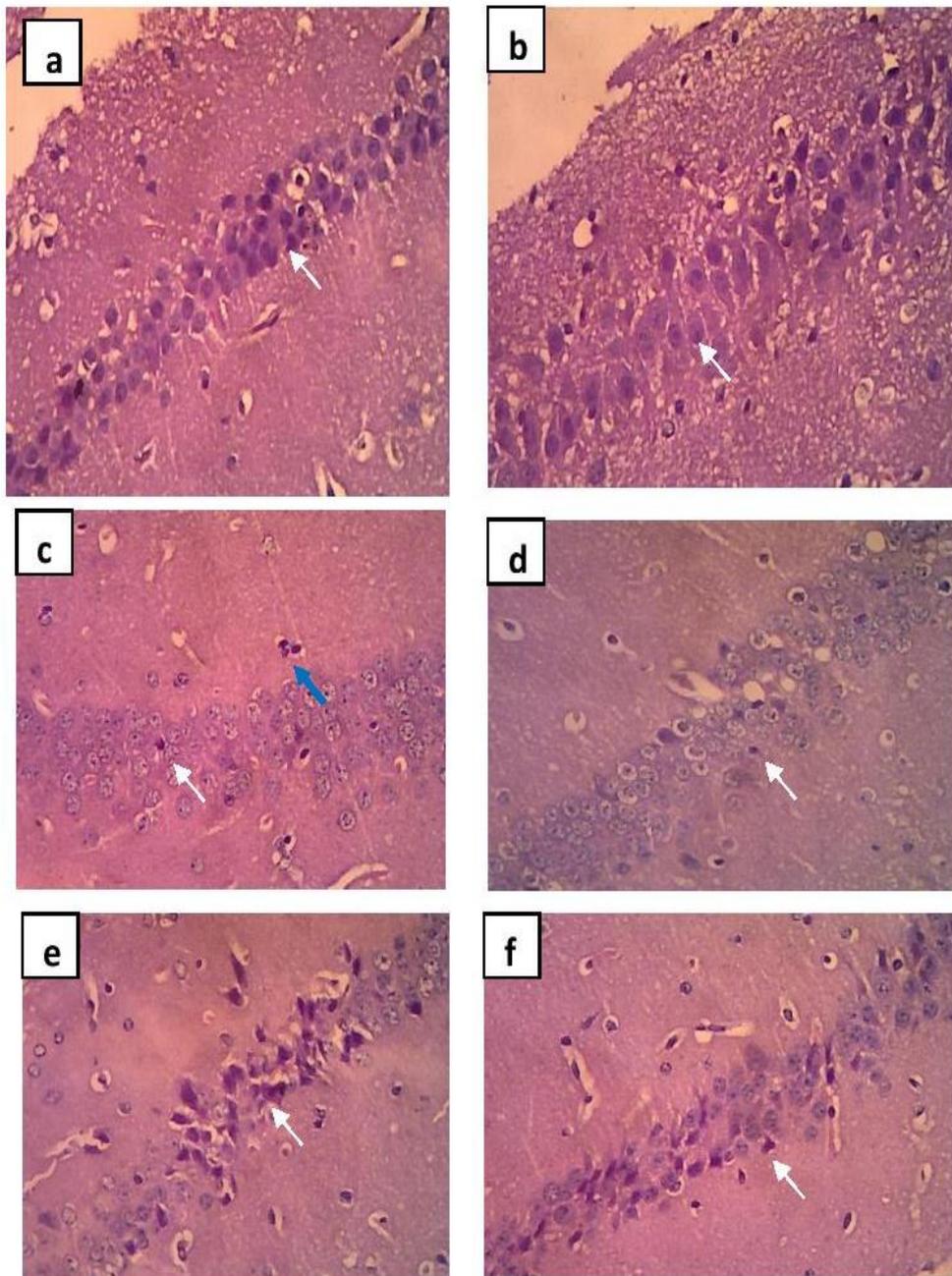
Pada tabel 9 menunjukkan jumlah sel pyramidal hipokampus otak mencit yang mengalami kerusakan di area CA1 dan CA2-CA3. Pada kelompok normal rata-rata

jumlah sel pyramidal di area CA1 adalah 2,2 dan CA2-CA3 adalah 2,4. Kemudian sesudah dilakukan induksi plumbum asetat 50 mg/kg BB terjadi peningkatan jumlah sel pyramidal yang mengalami kerusakan di area CA1 sebesar 20,0 dan di area CA2-CA3. Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung struktur sel pyramidal normal dan sel pyramidal rusak pada hipokampus. Sel pyramidal normal memiliki nukleus yang besar dengan nucleoli yang jelas, sedangkan sel pyramidal rusak ditandai dengan adanya inti neuron yang piknotik, padat, berwarna lebih gelap, batas tidak teratur dan adanya vakuolisasi (Abbas & El-Haleem, 2011). Terdapat beberapa faktor dan mekanisme yang dapat berperan dalam proses degenerasi sel saraf termasuk peningkatan stress oksidatif, kerusakan sel akibat radikal bebas, gangguan fungsi mitokondria dan eksitotoksisitas glutamate (Pagnussat & Achaval, 2007).

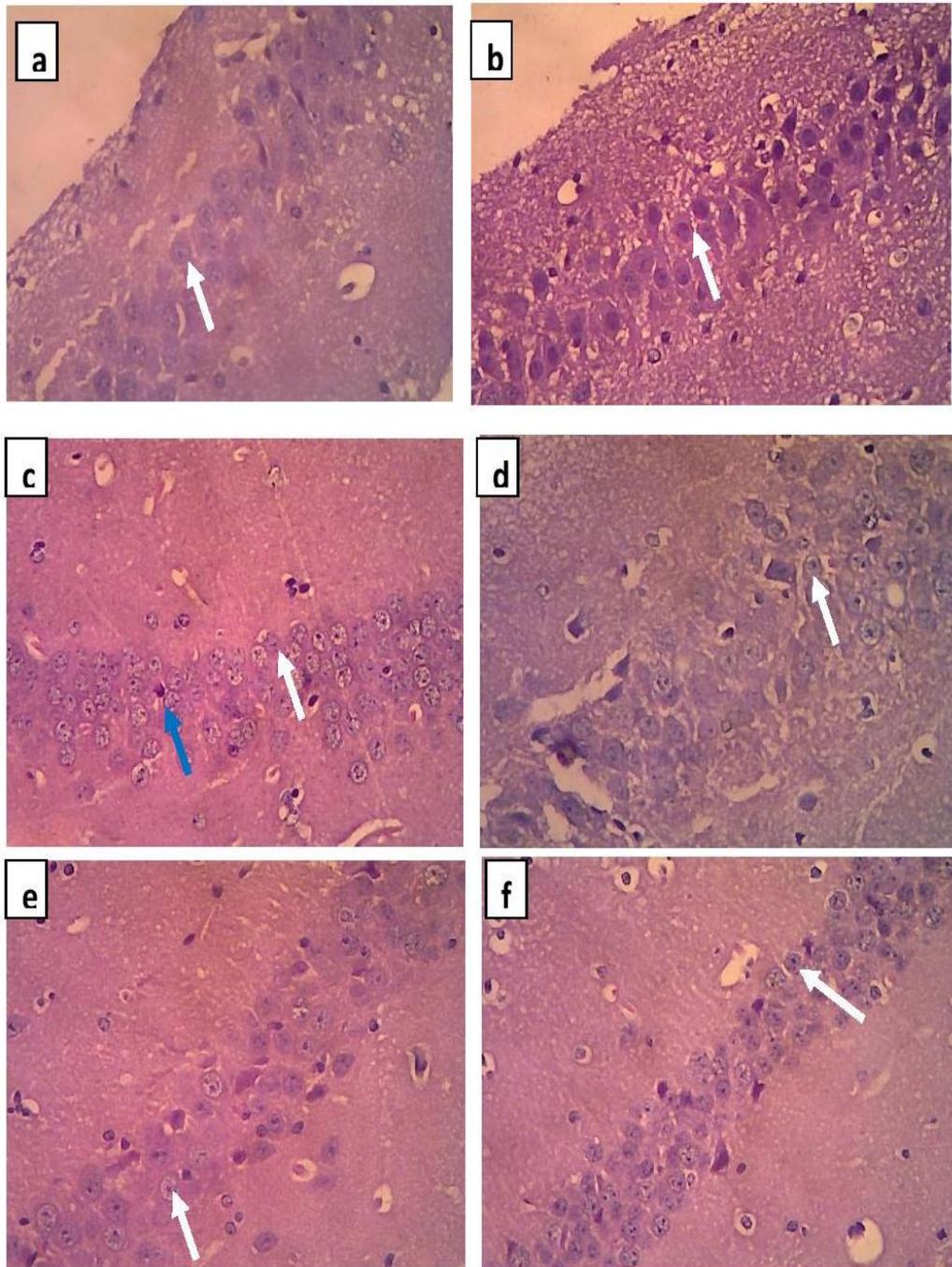
Hasil ini sesuai penelitian Liu *et al.* (2015) menunjukkan bahwa paparan Pb dapat memicu *microgliosis* abnormal dan *astrogliosis* pada hipokampus mencit muda, yang kemudian dapat mengganggu neurogenesis hipokampus. Lemaire *et al.* (2000) menyebutkan bahwa neurogenesis berhubungan dengan kemampuan belajar. Penelitian (Mello *et al.*, 1998) menunjukkan bahwa intoksikasi plumbum asetat dapat menyebabkan perubahan yang menyimpang terhadap perkembangan perilaku mencit. Pada penelitian Mello *et al.* (1998) mencit diintoksikasi dengan plumbum asetat sebanyak 1,0 mM. Pemberian diet yang mengandung Pb tinggi pada mencit saat menyusui menyebabkan gangguan pertumbuhan, perubahan hematologis, kerusakan *blood-brain barrier*, mortalitas yang meningkat, dan efek yang signifikan pada perkembangan neuromotorik mencit. Penelitian Manal *et al.* (2013) menunjukkan bahwa efek neurotoksik sudah dapat terjadi dengan induksi Pb selama 7 hari

Pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis berbeda pada sel pyramidal CA1 dan CA2 terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami kerusakan karena ekstrak etanol daun sirsak mempunyai zat antioksidan. Hal ini sesuai penjelasan Owolabi *et.,al.* (2013) daun sirsak menunjukkan aktivitas sitotoksik, antibakteri, dan antioksidan. Mekanisme penurunan jumlah sel pyramidal yang mengalami kerusakan oleh ekstrak etanol daun sirsak diduga berkaitan dengan peran kandungan fitokimia dalam ekstrak etanol daun sirsak. Flavonoid yang terkandung

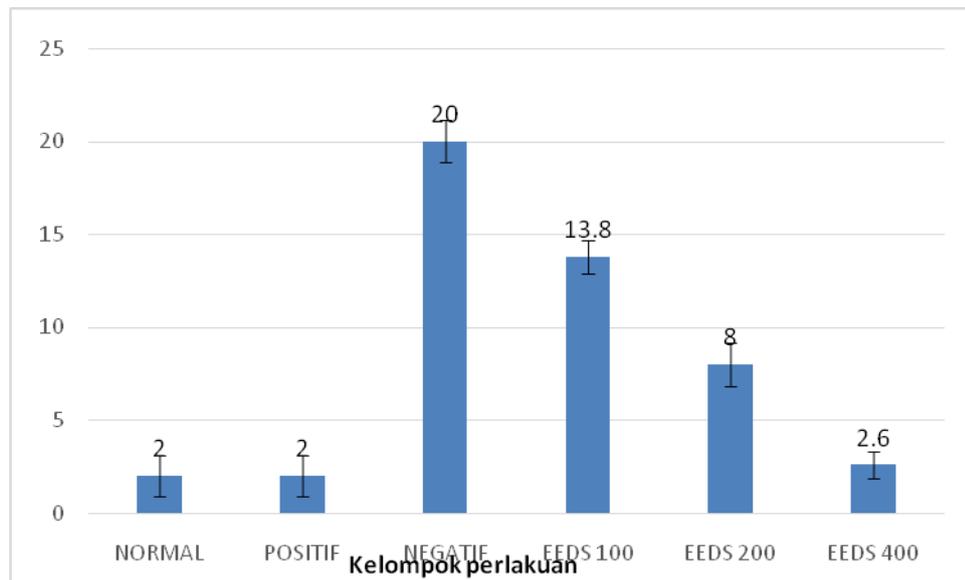
dalam ekstrak etanol daun sirsak mampu menghambat secara langsung enzim prooksidan seperti *xanthine oksidase* yang dapat menimbulkan ROS dan dapat menginduksi enzim protektif yang berperan dalam menginaktifkan elektrofil dan ROS serta dapat menghambat aktivitas isoenzim p450. Selain itu, ekstrak etanol daun sirsak merupakan antioksidan yang poten secara *in vitro* dan berpotensi memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif melalui aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas (Prihatiningsih, *et al.*,2017)



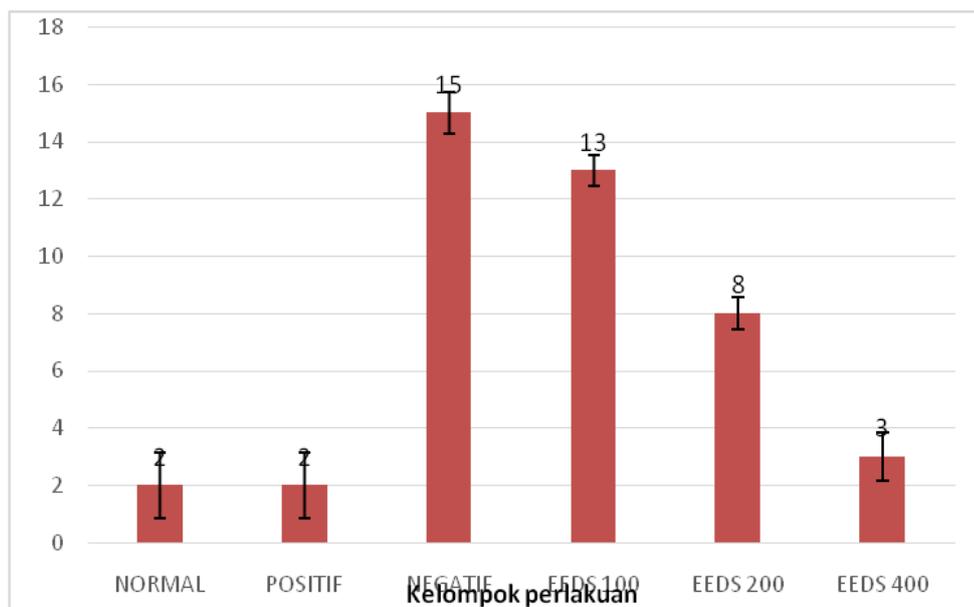
Gambar 16. Gambaran mikroskopis hipokampus area CA1 dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* perbesaran 400x, a) Normal; b) Kontrol positif; c) Kontrol negatif; d) EEDS 100 mg/kgBB; e) EEDS 200 mg/kgBB; f) EEDS 400 mg/kgBB. Tanda panah warna putih menunjukkan sel yang normal dan tanda panah warna biru menunjukkan sel yang rusak. Sel yang normal pada kelompok kontrol terlihat lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya



Gambar 17. Gambaran mikroskopis hipokampus area CA2-CA3 dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* perbesaran 400x, a) Normal; b) Kontrol positif; c) Kontrol negatif; d) EEDS 100 mg/kgBB; e) EEDS 200 mg/kgBB; f) EEDS 400 mg/kgBB. Tanda panah warna putih menunjukkan sel yang normal dan tanda panah warna biru menunjukkan sel yang rusak. Sel yang normal pada kelompok kontrol terlihat lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya



Gambar 18. Profil persentase daya kerusakan sel pyramidal hipokampus di sel area CA1



Gambar 19. Profil persentase daya kerusakan sel pyramidal hipokampus di sel area CA2-CA3

Pada gambar 17 dan 18 terdapat tanda panah putih yang menunjukkan sel pyramidal di area CA1 dan CA2-CA3 normal, tetapi pada tanda biru menunjukkan sel mengalami piknosis yang tampak menghitam, namun masih memiliki membran sel. Nukleus belum tampak terfragmentasi. Beberapa sel yang mengalami piknosis tampak lebih besar daripada sel normal, namun ada juga yang mempunyai ukuran

lebih kecil dari sel normal (Fajariah *et al*, 2010). Hal ini sesuai dengan pernyataan Ngabekti & Isnaeni (2000), piknosis atau pengerutan inti merupakan homogenisasi sitoplasma. Sel normal yang mengalami piknosis ini tampak lebih gelap daripada sel normal. Selain itu, sel rusak tampak semakin kecil dan mengkerut sehingga mempunyai bentuk yang tidak teratur. Menurut Hariyatmi (2004), salah satu perubahan yang diinduksi oleh radikal bebas yaitu perubahan sifat-sifat membran sel dan membran sitoplasmik pada unsur-unsur sel seperti mitokondria dan lisosom yang diakibatkan oleh lemak peroksida. Setelah merusak membran sel, efek toksik dapat juga mencapai inti dan merusaknya, yang mengakibatkan struktur sel menjadi tidak normal dan lama kelamaan bermuara pada nekrosis. Menurut Baroroh & Warsinah (2009), nekrosis ialah degradasi atau disorganisasi seluler yang irreversibel atau kematian sel jaringan tubuh sebagai akibat pengaruh jelas, dengan perubahan morfologi yang nyata pada inti sel sebagai piknosis, karyoreksis, dan karyolisi.

Ekstrak daun sirsak kandungan flavonoid, terpenoid, alkaloid, minyak atsiri, polifenol, saponin, dan tanin yang berperan sebagai anti tumor, antimikroba, antiparasit, dan antivirus (Amelia *et al*. 2012). Senyawa golongan flavonoid juga mampu menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel melalui mekanisme inhibisi enzim topoisomerase. Selain itu flavonoid juga menghambat aktivitas karsinogen melalui inhibisi sitokrom P450 sehingga senyawa karsinogen menjadi tidak reaktif. Flavonoid juga meningkatkan ekspresi enzim glutathion S-transferase yang dapat mendetoksifikasi karsinogen sehingga cepat dieliminasi tubuh (Ren *et al*. 2003). Daun sirsak memiliki efek sebagai antioksidan dari senyawa asetogenin yang dikandungnya yang berperan penting dalam menangkap radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan sel (Zakiah, *et al*, 2017)